

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



29

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : <b>C12N 15/38, 15/85, 5/00, 5/10, C12P 21/02</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 94/25599</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>10. November 1994 (10.11.94)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP94/01318</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>26. April 1994 (26.04.94)</b>		(30) Prioritätsdaten: <b>P 43 13 620.6 26. April 1993 (26.04.93) DE</b>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>WOLF, Hans [DE/DE]; Universität Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, D-93053 Regensburg (DE). SCHARFENBERG, Klaus [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). WAGNER, Roland [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</b>		(74) Anwälte: <b>BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters &amp; Bauer, Bereiteranger, D-81541 München (DE).</b>	

(54) Title: **MAMMAL CELL LINES AND METHOD OF OBTAINING GLYCOPROTEINS**

(54) Bezeichnung: **SÄUGERZELLINNEN UND VERFAHREN ZUR GLYKOPROTEINGEWINNUNG**

(57) Abstract

The invention concerns mammal cell lines, in particular hamster cell lines, which express in stable fashion the glycoproteins gp 250 (220), 350 and 250 (220)/350 as Epstein-Barr virus antigens, plus a method of obtaining these glycoproteins from cells cultivated in a protein-free medium.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Säugerzelllinien, insbesondere Hamster-Zelllinien, die stabil die Glykoproteine 250 (220), 350 und 250 (220)/350 als Epstein-Barr-Virus-Antigene exprimieren sowie ein Verfahren zur Gewinnung dieser Glykoproteine aus in proteinfreiem Medium kultivierten Zellen.

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mal	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

### Säugerzelllinien und Verfahren zur Glykoproteingewinnung

Das Epstein-Barr-Virus ist der Erreger der infektiösen Mononukleose des Menschen, einer der häufigsten Infektionserkrankungen junger Erwachsener.

Über 90 % der erwachsenen Bevölkerung hat eine Epstein-Barr-Virusinfektion durchgemacht. Diese EBV positiven Personen können später Erkrankungen, wie Nasopharynxkarzinome, B-Zell-Lymphome, T-Zell-Lymphome, bestimmte Formen des Hodgkin-Lymphomes, und möglicherweise weitere maligne Erkrankungen entwickeln. Direkt im zeitlichen Zusammenhang mit der Primärinfektion oder später werden auch chronische Verlaufsformen und in seltenen Fällen auch akut tödliche Fälle beschrieben.

Da bei Kleinkindern die Infektion mit Epstein-Barr-Virus klinisch unauffällig verläuft und da eine Impfung mit rekombinaten Vakziniaviren, die das Epstein-Barr-Virus-Membranantigen gp 250/350 (BLLF-1 Leserahmen, Baer et al., 1984) exprimieren, einen Schutz vor Infektion bzw. Erkrankungen zeigen (Gu et al., 1993), ist davon auszugehen, daß eine Impfung gegen Epstein-Barr-Virus -korrelierte Erkrankungen möglich ist.

Wegen der möglichen Nebenwirkungen von Lebendimpfstoffen ist die Entwicklung reiner Proteinvakzinen daher ein wichtiges Ziel. Da das Epstein-Barr-Virus-Membranprotein gp 250/350 (BLLF-1) sehr stark glykoliert ist und diese posttranskriptionelle Modifikation eine wichtige Komponente der korrekten Immunogenität ist (Emini et

al., 1988), ist die Entwicklung einer Vakzine auf der Basis eines in Eukaryotenzellen herstellbaren Glykoproteins auf der Basis des gp 250/350 (Leserahmen BLLF-1 des Epstein-Barr-Virus) ein erfolgversprechender Weg.

Die Erfindung betrifft Säugerzelllinien, insbesondere Hamster-Zelllinien, die stabil das Glykoprotein (gp 250 (220)), das Glykoprotein (gp 350) und/oder das Misch-Glykoprotein (gp 250 (220)/(gp) 350) als Epstein-Barr-Virus-Antigene exprimieren können, insbesondere in einem proteinfreien Medium. Damit wird das Risiko einer viralen oder bakteriellen Kontamination durch Mediensupplemente verhindert. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung der genannten Glykoproteine.

Hamster-Zelllinien, die stabil gp 250 (220), gp 350 und oder gp 250 (220)/gp 350 als EBV-Antigene exprimieren, sind bekannt; vergleiche beispielsweise Motz et al. in Gene, 44 (1986) 353-359 und Vaccines, 87 (1987) 374-379 sowie Gu Shyan et al. in 100 Jahre Blutserum-Therapie 1890-1990, Halle (Saale), (1991) 93-100. Bisher sind jedoch noch keine Hamster-Zelllinien bekannt geworden, mit denen sich die genannten Glykoproteine stabil exprimieren lassen. Nach Motz et al. in Vaccines, 87 (1987) 374-379, 376 kann die Integration der viralen Fremd-Glykoproteine in CHO-Zellmembranen über einem bestimmten Anteil hinaus toxisch sein.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wurde nun durch die Anwendung einer gezielten genetischen Strategie eine Hamster-Zelllinie zur Verfügung gestellt, die stabil die genannten Glykoproteine hoch exprimiert und sekretiert und dadurch erhältlich ist, daß man

- die Zelllinie mit einem die genannten Glykoproteine exprimierenden Vektor, der jedoch den Membrananker nicht exprimiert, durch Transfektion infiziert (Motz et al., 1987),
- wobei der Vektor einen Selektionsmarker umfaßt, der der Zelllinie fehlt,

- die Zelllinie kultiviert und mit Hilfe des Selektionsmarkers auf Zellen selektioniert, die nach Weglassen des selektionierenden Faktors (Inhibitors) stabil die Glykoproteine exprimieren und sekretieren.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wurde ferner durch die Anwendung eines Verfahrens eine Hamster-Zelllinie zur Verfügung gestellt, die stabil die genannten Glykoproteine in einem proteinfreien Medium exprimiert und dadurch erhältlich ist, daß man

(A) von einer Hamster-Zelllinie (Wirtszelllinie) ausgeht, der ein Selektionsmarker fehlt, den ein später gemäß (A) (d) chromosomal zu integrierender Vektor oder ein gemäß (B) chromosomal integrierter Vektor aufweist (rekombinante Zelllinie),

(a) die Zellen in einem serumhaltigen Medium kultiviert und dabei am Substrat und aneinander haften läßt,

(b) wiederholt einen Teil des verbrauchten Mediums austauscht, beim Austausch allmählich den Serumgehalt des Mediums herabsetzt und schließlich serumfrei kultiviert und dabei

--- die Adhärenz der Zellen nicht aktiv aufhebt und

--- gegebenenfalls Sphäroide von Zellen bilden und ablösen läßt, die abgelösten Zell-Sphäroide abtrennt, in Suspension unter schonender Bewegung kultiviert und auf Zellen selektioniert, die in kleinen Aggregaten oder einzeln wachsen und

(c) schließlich die selektionierten Zellen den Verfahrensmaßnahmen von Anspruch 1 unterwirft, oder

(B) daß man eine Hamster-Zelllinie gemäß Anspruch 1 den Verfahrensschritten (A) (a) bis (A) (b) unterwirft.

Die Ausgangszelllinie oder die Wirtszelllinie läßt man also in einem serumhaltigen Kulturmedium wachsen, beispielsweise in MEM alpha- bzw. a- + 5 % FCS, da sich diese Zelllinie noch nicht in Medien transferieren und in Medien kultivieren läßt, die frei von Serum sind. Beispiele für solche Kulturmedien sind DIF 1000, RPMI 1640, ASF 103 und HDB.

Um ein Wachstum in proteinfreiem Kulturmedium zu erreichen, sind 3 Aspekte anzuführen.

1. Man nutzt die Adhärenz während der Serumentwöhnung der Kultur aus, wobei man beispielsweise in Kulturflaschen arbeitet. Hierdurch ergibt sich eine positive Wachstumsstimulierung. Außerdem lassen sich somit altes verbrauchtes Medium und tote Zellen sowie Lyseprodukte leicht und sehr schonend (ohne Zentrifugation) abtrennen.

2. Altes Medium wird wiederholt nur teilweise ausgetauscht, um eine gute Selbstkonditionierung des Mediums während der Serumausdünnung zu garantieren.

3. Man führt eine Langzeitkultivierung der Zellen unter schonender Durchmischung durch, beispielsweise in Spinnerflaschen in Suspensionskultur unter Sphäroidbildung. Durch gezielte Selektionierung auf verringertes Adhärenzbestreben lassen sich Zellen isolieren, die in kleinen Aggregaten (Sphäroiden) oder einzeln wachsen. Zuerst wird man große Sphäroide separieren. Danach wird der Überstand bei niedrigen g-Zahlen fraktioniert zentrifugiert und die separierten kleinen Sphäroide und Einzelzellen für eine weitere Passagierung verwendet.

Ein Wachstum ist in folgendem proteinfreien Medium unter Anwendung der in Anspruch 2 aufgeführten Strategie möglich. Das Medium ist nachstehend mit SMIF (Scharfenberg's Modified Iscove's-F12 Medium) bezeichnet. Es handelt sich um ein gut angereichertes Medium, bestehend aus einer ungefähren 1:1 Mischung von Iscove's-Modifiziertes-Dulbecco's Medium mit Ham's-F12-Nährlösung (IF), dem zusätzlich beispielsweise noch Putrescin (zum Beispiel 1,2 Mikromol  $l^{-1}$ ) und L-Hydroxyprolin (zum Beispiel 153 Mikromol  $l^{-1}$ ) (SMIF1) zugegeben werden können. Darüberhinaus sind bei einem Wachstum in Suspension vorteilhafterweise Chelatoren, wie Aurintricarboxylsäure (ATA, zum Beispiel 3 Mikromol  $l^{-1}$ ) (Bertheussen, 1993), EDTA (zum

Beispiel 4.3 Mikromol 1<sup>-1</sup>) und Citronensäure (zum Beispiel 40 Mikromol 1<sup>-1</sup>), zur Komplexierung von divalenten Ionen und zur besseren Verfügbarkeit anorganischen Eisens als Ersatz für die in serumfreien Medien übliche Proteinkomponente Transferrin hinzuzufügen (SMIF2).

Gemäß einer speziellen Ausführungsform der Erfindung sind Hamster-Zelllinien dadurch erhältlich, daß man von einer Chinese-Hamster-Ovary-Zelllinie (CHO), beispielsweise von CHO K1 = ATTC CCL 61, oder von einer Baby-Hamster-Kidney-Zelllinie (BHK), beispielsweise BHK 21C13 = ATCC CCL 10, ausgeht.

Wenn sich erfindungsgemäß Hamster-Zelllinien mit Generationszeiten im Bereich von beispielsweise 15 bis 40 und insbesondere 20 bis 30 h zur Verfügung stellen lassen, mit denen die genannten Glykoproteine stabil exprimierbar sind, so ist diese Leistung insofern als erfinderisch zu bewerten, daß es bisher noch nicht gelungen ist, Hamster-Zelllinien in proteinfreiem Medium ohne gezielte Genmanipulation (genetic engineering) zu kultivieren. Bisher war man der Meinung, daß man Säugerzelllinien für ein Wachstum in proteinfreiem Medium zur Expression gewünschter Genprodukte durch Genmanipulation vorbereiten muß (NSO cell line, Hassel et al., 1992).

Für Selektionsmarker und Inhibitoren kann sich der Fachmann an den relevanten Stand der Technik halten. Ein Beispiel für einen geeigneten Selektionsmarker ist das Dihydrofolatreduktase-Gen (DHFR-Gen) und ein Beispiel für einen geeigneten Inhibitor ist Methotrexat (MTX) (Motz et al., 1987).

Eine spezielle Ausführungsform der Erfindung ist schließlich die Hamster-Zelllinie CHO pMDIIIGPTR-PFC6 = DSM ACC 2121.

Gp 250 (220), gp 350 und/oder gp 250 (220)/gp 350 lassen sich erfindungsgemäß dadurch gewinnen, daß man

- (a) eine erfindungsgemäße Zelllinie kultiviert und die gewünschten Glykoproteine exprimieren lässt,
- (b) die Zellen vom Kulturmedium abtrennt, insbesondere durch Mikrofiltration,
- (c) danach den klaren Rohüberstand durch Ultrafiltration aufkonzentriert und aufreinigt, insbesondere durch Querstrom-UF,
- (d) danach mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule,
- (e) einer Ultrafiltration und
- (f) einer Gelfiltration aufreinigt und die anfallenden Fraktionen reiner Glykoproteine (gp) gewinnt.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich die Glykoproteine nativ und glykosiliert gewinnen. Damit besitzen sie ihr natürliches antigenes Potential. Der auf diese Weise gewonnene Impfstoff hat dementsprechend antigene Eigenschaften, die denen der entsprechenden Proteine des aktiven EB-Virus entsprechen. Der gewonnene Impfstoff stellt damit eine sichere Vakzine mit einem hohen Potential an antigenem Schutz ohne pathogenes Potential dar. Die rekombinante Vakzine ist damit einer inaktivierten oder abgeschwächten Vakzine bezüglich der Sicherheit überlegen, da weder ein Potential zur Reversion abgeschwächter Viren noch das Restrisiko und die Toxikologie inaktivierter Viren zu befürchten sind.

#### Beispiel 1: Gewinnung von CHO pMDIIIGPTR-PFC6

Es wurde ein von der Zelllinie CHO K1 = ATCC CCL61 abgeleiteter Clon, dem das Dihydrofolat-Reduktase-Gen fehlt (dhfr-1), mit dem Plasmid pMDIIIGP gemäß Motz et al. in Gene, 44 (1986) 353-359, Motz et al. in Gene, 58, (1987) 149-154 und Vaccines, 87 (1987) 374-379 transfiziert. Die Zellen wurden kultiviert und mit Hilfe von Methotrexat (MTX) auf Klone selektioniert, die auch nach Weglassen des Inhibitors stabil gp 250/350 exprimierten. Ein Klon mit stabiler Expression von gp 250/350 wurde als CHO C6 bezeichnet.

**Beispiel 2: Kultivierung von CHO C6 in proteinfreiem Medium**

Man arbeitete unter Standardzellkulturbedingungen. CHO C6 wurde in IF-Medium mit einem Gehalt an 5 % fötalem Kälberserum (FCS) auf 1 bis 2 großen Kulturflaschen ( $185 \text{ cm}^2$ , etwa 40 bis 50 ml Volumen; Falcon) bis zur absoluten Zellkonfluenz kultiviert, wobei sich teilweise bereits Multilayers ausbildeten. Die anschließende Ausdünnung von FCS erfolgte stufenweise über einen FCS-Anteil von 1, 0,2, 0,04 und 0,008 %, indem immer 4/5 des alten Mediums unter Einschluß lebender und toter freier Zellen sowie Lyseprodukten durch frisches, vorgewärmtes SMIF1 ersetzt wurden. Sofern die Kultur bereits bei geringen FCS-Gehalten freie Sphäroide bildete, konnten sich diese vor der Mediumentnahme absetzen. Der Zeitpunkt des Austausches wurde durch die Vitalität und den Zustand der Kultur bedingt und wurde von Fall zu Fall festgelegt, spätestens dann, wenn der Kulturüberstand zu geringe Mengen an Nährstoffen enthielt. Ein guter Richtwert für einen Wechsel ist ein Glucose-Gehalt von etwa 0,7 bis 1 g/l. Spätestens wurde nach einer Woche zu einem geringeren Teil ausgetauscht, um zerfallene Nährsubstanzen zu ergänzen.

Wenn das Medium mit einem Gehalt von 0,008 % FCS erschöpft war, wurde das gesamte Medium durch frisches proteinfreies vorgewärmtes SMIF1 ersetzt und weiter in den Kulturflaschen kultiviert. Falls sich unter diesen Bedingungen bereits genügend Sphäroide bildeten und ablösten, wurden diese Sphäroide in eine kleine Spinner-Kulturflasche (40 ml minimales Volumen) transferiert und in 40 ml SMIF1 (1/4 altes konditioniertes plus 3/4 frisches Medium) bei etwa 40 U/min kultiviert. Falls sich die Zellen nicht ablösten, mußte der Zellrasen enzymatisch vom Substrat isoliert werden, wie er für das Passagieren adhärenter Zellen normal ist. Die in diesem Zustand sehr leicht verklumpenden Zellen wurden nach Ablösen zweimal durch SMIF1 Medium von Protease freigeswaschen, bevor die Zel-

len ebenfalls in einen kleinen Spinnerflasche transferiert werden konnten.

Die Zellen wurden in der Spinnerflasche solange kultiviert, bis Generationszeiten von weniger als 40 h erhalten wurden und die Kultur in kleinen Sphäroiden wuchs. Die Passagierung erfolgte bei einem Richtwert von etwa 0,5 bis 1 g Rest-Glucose/l im Medium. Es wurden gezielt kleine Sphäroide und einzelne Zellen passagiert. Hierfür ließ man die Zellkultursuspension kurze Zeit ungerührt stehen, so daß sich große Sphäroide absetzen konnten, wonach man den Überstand (100 g) zentrifugierte. Die Zellen im Pellet wurden dann in die nächste Passage überführt. Das Kulturmedium wurde konditioniert, indem man 20 bis 30 Vol.-% Medium der vorherigen Passage addierte, welches zuvor von toten Zellen und Zellbruchstücken mittels Filtration oder Zentrifugation befreit worden war.

Für zwei Adoptionsversuche dauerte der gesamte Vorgang jeweils länger als zwei Monate.

**Beispiel 3: Aufarbeitung und Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus Kulturüberständen**

#### I. Querstrom-Ultrafiltration mit anschließender Umpufferung

Hierfür wurden die mikrofiltrierten Ernten von Fermentationen in proteinfreien SMIF1 oder SMIF2 verwendet, und zwar aus kontinuierlich perfundierter Kultur bis zum 2-l-Maßstab oder aus satzweiser Kultur im 10-l-Airlift-Fermenter. Zur Filtration wurden Filterkassetten einer nominalen Ausschlußgrenze (Cut off) von 100 kD (Millipore oder Filtron) eingesetzt. Richtwerte während der Querstrom-Ultrafiltration bei relativ freier Wahl waren:

- Transmembrandruck nicht über ca. 1 bar;
- etwa 1/3 des im Kreislauf befindlichen zu filtrierenden Roh-überstandes wurde vom Volumenstrom als Filtrat abgetrennt; das entsprach bei einer Filterkassette und einer Ansaugleistung von beispielsweise 8 l/min etwa 2-3 l Filtratbildung;
- während des Pufferaustausches wurden geringere Pumpleistungen angewandt.

Im allgemeinen wurden die folgenden Stufen vorgesehen, wobei auf die beiden ersten Schritte verzichtet werden konnte, die allerdings die Ausbeute erhöhen können.

1. Man bestimmte das Erntegesamtvolumen und erzeugte etwa 15 Vol.-% Filtrat (bezogen auf die Volumenströme unter normalen Filtrationsbedingungen), um die Membran zu konditionieren, d. h. eine konstante effektive Filtrationsausschlußgrenze durch Belegung sowie Polarisierung der Membran einzustellen.
2. Dieses erste Filtrat wurde zum Retentat rückgeführt.
3. Die eigentliche Querstrom-Ultrafiltration wurde durchgeführt, bis das Retentat auf etwa 1/50-tel des Ausgangsvolumens reduziert war. Es ist jedoch eine noch stärkere Aufkonzentrierung möglich, und dies insbesondere durch die Verwendung proteinfreien Mediums.
4. Pufferwechsel und Waschprozeß des Primär-Retentats erfolgten, nachdem das Endvolumen erreicht war. Dazu wurde drei- bis viermal das Retentat auf das doppelte Volumen (unter Einschluß des Totvolumens des Pumpen- und UF-Systems) mit Phosphatpuffer (20 mM von pH 7) aufgefüllt und jeweils wieder auf das minimale Retentatvolumen aufkonzentriert und für die weitere Aufarbeitung vorgesehen. Dieser Schritt erfolgte zur Entfernung niedermolekularer Fremdproteine und zur Reduzierung der Ionenstärke für den folgenden Aufreinigungsschritt.

## II. Aufreinigung mit einer Anionenaustauschersäule

Es wurde die folgende Ausstattung gewählt.

Säulenmaterial: Q-Sepharose High Performance (ein BioProcess-Material von Pharmacia)

Puffersystem: Puffer A: 20 mM Phosphatpuffer (pH 5,1)  
Puffer B: 20 mM Phosphatpuffer (pH 5,1) mit 1 M NaCl

Maßstab: beispielsweise kleiner Maßstab mit FPLC-Anlage und Säule HR 5/5 mit 1 ml Bettvolumen (Pharmacia); Scale-up möglich.

Durchfluß: konstant 5,1 cm/min entsprechend 1 ml/min bei HR 5/5

Das Ultrafiltrations-Retentat wurde mit MiliQ-Prozeßwasser auf eine Leitfähigkeit von weniger als 3 mS verdünnt und mit HCl auf einen pH-Wert von 5,1 eingestellt (beispielsweise zuerst auf pH 4,2, um einen größeren Anteil Fremdproteine zu fällen und dann zurück auf pH 5,1). Die entstehende Trübung wurde durch Zentrifugieren ausgefällt. Danach wurde der klare Überstand über eine FPLC-Pumpe unter Zudosierung eines 5-proz. Anteils von Puffer B auf die Säule aufgetragen, um erstes Fremdprotein zu eluieren. Die maximale Beladung betrug etwa 8 mg Gesamtprotein/ml Gel. Nach dem Auftrag wurde das Protein durch einen Gradienten bis 0,4 M NaCl eluiert (Anstieg über 22 Säulenvolumina).

Das gewünschte gp 250/350 Protein eluierte zwischen 0,15 und 0,35 M NaCl-Anteil, wobei die genaue Auswahl der weiter aufzureinigenden Fraktionen nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) entschieden wurde. Ein Proteinauftrag sowie eine Auftrennung ließ sich auch ohne Zudosierung von Puffer B und auch bei anderen pH-Werten (z.B. pH 7) erreichen. Der niedrige pH-Wert sowie die Zudo-

sierung von Puffer B während des Auftrages erhöhen bei der Chromatographie die Leistungsfähigkeit in Bezug auf die gp Proteine.

Sofern Phosphatpuffer verwendet wurde, konnte auf einen Umpuffierungsschritt vor den folgenden Aufarbeitungsschritten verzichtet werden. Jedoch sind auch andere Puffersysteme, wie beispielsweise Citratpuffer, möglich.

### III. Ultrafiltration

Die ausgewählten und vereinigten Proteinfraktionen von Schritt II wurden durch Ultrafiltration vor dem Auftrag auf eine Gelfiltrationssäule um einen Faktor von etwa 10 bis 20 aufkonzentriert. Die Proteinendkonzentrationen lagen beispielsweise im Bereich von 1 bis 2 mg/ml. Für die Ultrafiltration wurden Minicon CS15-Kammern (Amicon) verwendet. (Bei größeren Lösungsvolumina ist an entsprechend größere Filtrationsgeräte mit größerer Kapazität zu denken, beispielsweise an Rührzellen oder Querstrom-Ultrafiltrationsmodule.)

### IV. Reinigung durch Gelfiltration

Säulenmaterial: Fertigsäulen HR 10/30 mit Superose 6 (Pharmacia); für ein Scale up wurde Sephadryl S-300 High Resolution und Sephadryl S-400 High Resolution in einer XK 26/100 Säule (Pharmacia) verwendet.

Puffersystem: Isokratisch 100 bzw. 200 mM NaCl in einem 20 mM Phosphatpuffer (pH 7).

Durchfluß: beispielsweise 2-2,5 mm/min

Nach der Äquilibrierung der Säule wurden beispielsweise 10 g Protein pro ml Gelbett aufgetragen, die zuvor aufkonzentriert (CS15) und durch Zentrifugieren von Trübstoffen befreit worden war. Man eluierte bei einem Fluß von etwa 2,5 mm/min und trennte auf. Vereinigt wurden die Elutionsfraktionen, die nach PAGE und Silberfärbung gp 250 und oder gp 350 ohne sichtbare Verunreinigungen enthielten.

Reines gp 250/350 ist in gesammelten gp-Fraktionen der Gelfiltration eingefroren bei etwa -20 °C stabil lagerbar. Insgesamt wurden durch den Aufreinigungsprozeß etwa 25-40 % des Rohproduktes rein gewonnen.

#### **Vergleichsbeispiel 1**

Es wurde Beispiel 2 mit der Ausnahme wiederholt, daß man in der Serumentwöhnungsphase keine Zellkonfluenz zuließ und die FCS-Ausdünnung bei aufgehobener Zell-Adhärenz vornahm. Bei diesem Vorgehen konnten keine in proteinfreiem Medium kultivierbaren Zellen erhalten werden.

#### **Literatur**

Baer, R. et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310 (1984) 207-211.

Bertheussen, K. Growth of cells in a new defined protein-free medium. *Cytotechnology*, 11 (1993) 219-231

Emini, E. A. et al. Antigenic Analysis of the Epstein-Barr virus major membrane antigen (gp 350/220) expressed in yeast and mammalian cells; implications for the development of a subunit vaccine. *Virology*, 166 (1988) 387-93.

Gu, S. et al. On the first EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. Proceedings of the Vth International Symposium on "Epstein-Barr virus and associated Diseases", Annecy, 1992 (1993)

Hassel, T. et al. Stability of recombinant antibodies from glutamine synthetase amplified CHO and NSO cell lines. In: Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products (Spier, R.E., Griffiths, J.B., MacDonald, C., eds.) Butterworths-Heinemann, Oxford, (1992) 42-47

Motz, M. et al. Truncated versions of the two major Epstein-Barr viral glycoproteins (gp250/350) are secreted by recombinant Chinese hamster ovary cells. Gene, 58 (1987) 149-154

**Patentansprüche**

1. Säugerzelllinie, die stabil das Glykoprotein (gp) 250 (220), das Glykoprotein (gp) 350 und/oder das Misch-Glykoprotein (gp) 250 (220)/(gp) 350 als Epstein-Barr-Virus-Antigene exprimiert und dadurch erhältlich ist, daß man
  - die Zelllinie mit einem die genannten Glykoproteine (gp) exprimierenden Vektor durch Transfektion infiziert,
  - wobei der Vektor einen Selektionsmarker umfaßt, der der Zelllinie fehlt,
  - die Zelllinie kultiviert und mit Hilfe des Selektionsmarkers auf Zellen selektioniert, die nach Weglassen des selektierenden Faktors (Inhibitors) stabil die Glykoproteine exprimieren.
2. Säugerzelllinie, die stabil das Glykoprotein (gp) 250 (220), das Glykoprotein (gp) 350 und/oder das Misch-Glykoprotein (gp) 250 (220)/(gp) 350 als Epstein-Barr-Virus-Antigene in einem proteinfreien Medium exprimiert und dadurch erhältlich ist, daß man
  - (A) von einer Hamster-Zelllinie ausgeht, der ein Selektionsmarker fehlt, den ein später gemäß (A) (d) chromosomal zu integrierender Vektor oder ein gemäß (B) chromosomal integrierter Vektor aufweist,
    - (a) die Zellen in einem serumhaltigen Medium kultiviert und dabei am Substrat und aneinander haften läßt,
    - (b) wiederholt einen Teil des verbrauchten Mediums austauscht, beim Austausch allmählich den Serumgehalt des Mediums herabsetzt und schließlich serumfrei kultiviert und dabei
      - die Adhärenz der Zellen nicht aktiv aufhebt und

- 15 -

--- gegebenenfalls Sphäroide von Zellen bilden und ablösen läßt, die abgelösten Zell-Sphäroide abtrennt, in Suspension unter schonender Bewegung kultiviert und auf Zellen selektioniert, die in kleinen Aggregaten oder einzeln wachsen und

(c) schließlich die selektionierten Zellen den Verfahrensmaßnahmen von Anspruch 1 unterwirft oder

(B) daß man eine Säugerzelllinie gemäß Anspruch 1 den Verfahrensschritten (A) (a) bis (A) (b) unterwirft.

3. Säugerzelllinie nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Säugerzelllinie eine Hamsterzelllinie, insbesondere eine Chinese-Hamster-Ovary-Zelllinie (CHO), beispielsweise CHO K1 = ATCC CCL61, oder eine Baby-Hamster-Kidney-Zelllinie (BHK), beispielsweise BHK 21 C13 = ATCC CCL10, verwendet.

4. Hamster-Zelllinie nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Selektionsmarker das Dihydrofolat-Reduktase-Gen (DHFR-Gen) und als Inhibitor Methotrexat (MTX) verwendet.

5. Hamster-Zelllinie CHO-K1 pMDIIIGPTR-PFC6 = DSM ACC 2121.

6. Verfahren zur Gewinnung des Glykoproteins (gp) 250 (220), des Glykoproteins (gp) 350 und/oder des Mischproteins (gp) 250 (220)/(gp) 250, dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) eine Zelllinie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 kultiviert und die gewünschten Glykoproteine exprimieren und ins Medium sekretieren läßt,

(b) die Zellen vom Kulturmedium abtrennt, insbesondere durch Mikrofiltration,

(c) danach durch Querstrom-Ultrafiltration aufkonzentriert und aufreinigt,

- 16 -

- (d) danach mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule,
- (e) einer Ultrafiltration und
- (f) einer Gelfiltration aufreinigt und die anfallenden reinen Glykoproteinfaktionen (gp) gewinnt.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 94/01318A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 C12N15/38 C12N15/85 C12N5/00 C12N5/10 C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY vol. 599, no. 1-2 , 22 May 1992 , ELSEVIER SCIENCE PUBL., B.V.,AMSTERDAM, NL; pages 267 - 272 M. HESSING ET AL. 'Purification and quantification of recombinant Epstein-Barr viral glycoproteins gp350/220 from Chinese hamster ovary cells' see page 267, left column, line 1 - page 272, left column, line 25 ---	1,3,4
Y	-/--	2,5,6

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*B\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 August 1994

Date of mailing of the international search report

26 -08- 1994

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

## Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 94/01318

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GENE vol. 58, no. 1, 1987, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; pages 149 - 154 M. MOTZ ET AL. 'Truncated version of the two Epstein-Barr viral glycoproteins (gp250/350) are secreted by recombinant Chinese hamster ovary cells' cited in the application see page 149, left column, line 1 - page 154, left column, line 7 ---	1,3,4
Y	EP,A,0 485 689 (RIKAGAKU KENKYUSHO) 20 May 1992 see page 6, line 36 - line 44 see page 12, line 3 - line 4; claim 19 ---	2,5,6
Y	EP,A,0 312 164 (MERCK & CO. INC.) 19 April 1989 see page 6, column 9, line 50 - page 8, column 14, line 39 ---	2
A	GENE vol. 44, no. 2-3, 1986, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; pages 353 - 359 M. MOTZ ET AL. 'Expression of the Epstein-Barr virus major membrane proteins in Chinese hamster ovary cells' cited in the application the whole document ---	6
A	EP,A,0 274 445 (MEDI-CULT A/S) 13 July 1988 the whole document ---	1-6
A	EP,A,0 481 791 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 22 April 1992 the whole document -----	1-5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.  
PCT/EP 94/01318

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0485689	20-05-92	JP-A- US-A-	4228066 5254462	18-08-92 19-10-93
EP-A-0312164	19-04-89	JP-A-	2000475	05-01-90
EP-A-0274445	13-07-88	AU-B- AU-A- DE-A- DE-T- JP-A- US-A- US-A-	596491 1011588 3882540 3882540 63279786 5045467 5045454	03-05-90 14-07-88 02-09-93 18-11-93 16-11-88 03-09-91 03-09-91
EP-A-0481791	22-04-92	AU-B- AU-A- JP-A- US-A-	645615 8591591 6070757 5316938	20-01-94 07-05-92 15-03-94 31-05-94

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 94/01318A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 5 C12N15/38 C12N15/85 C12N5/00 C12N5/10 C12P21/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
IPK 5 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY Bd. 599, Nr. 1-2, 22. Mai 1992, ELSEVIER SCIENCE PUBL., B.V., AMSTERDAM, NL; Seiten 267 - 272 M. HESSING ET AL. 'Purification and quantification of recombinant Epstein-Barr viral glycoproteins gp350/220 from Chinese hamster ovary cells' siehe Seite 267, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 272, linke Spalte, Zeile 25 ----	1,3,4
Y	---	2,5,6

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*'L' Veröffentlichung, die gezeigt ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Nutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*'V' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2 Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

18. August 1994

26-08-1994

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2.  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 94/01318

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GENE Bd. 58, Nr. 1, 1987, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 149 - 154 M. MOTZ ET AL. 'Truncated version of the two Epstein-Barr viral glycoproteins (gp250/350) are secreted by recombinant Chinese hamster ovary cells' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 149, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 154, linke Spalte, Zeile 7 ---	1,3,4
Y	EP,A,0 485 689 (RIKAGAKU KENKYUSHO) 20. Mai 1992 siehe Seite 6, Zeile 36 - Zeile 44 siehe Seite 12, Zeile 3 - Zeile 4; Anspruch 19 ---	2,5,6
Y	EP,A,0 312 164 (MERCK & CO. INC.) 19. April 1989 siehe Seite 6, Spalte 9, Zeile 50 - Seite 8, Spalte 14, Zeile 39 ---	6
A	GENE Bd. 44, Nr. 2-3, 1986, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 353 - 359 M. MOTZ ET AL. 'Expression of the Epstein-Barr virus major membrane proteins in Chinese hamster ovary cells' in der Anmeldung erwähnt the whole document ---	1-6
A	EP,A,0 274 445 (MEDI-CULT A/S) 13. Juli 1988 the whole document ---	1-5
A	EP,A,0 481 791 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 22. April 1992 the whole document -----	1-5

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/01318

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0485689	20-05-92	JP-A-	4228066	18-08-92
		US-A-	5254462	19-10-93
EP-A-0312164	19-04-89	JP-A-	2000475	05-01-90
EP-A-0274445	13-07-88	AU-B-	596491	03-05-90
		AU-A-	1011588	14-07-88
		DE-A-	3882540	02-09-93
		DE-T-	3882540	18-11-93
		JP-A-	63279786	16-11-88
		US-A-	5045467	03-09-91
		US-A-	5045454	03-09-91
EP-A-0481791	22-04-92	AU-B-	645615	20-01-94
		AU-A-	8591591	07-05-92
		JP-A-	6070757	15-03-94
		US-A-	5316938	31-05-94